

**ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА DNA-COMET ASSAY ДЛЯ ОЦЕНКИ УРОВНЯ
ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК РАКОВЫХ КЛЕТОК ЛИНИИ HeLa,
ВЫЗВАННЫХ ОСНОВАНИЯМИ ШИФФА
И ИХ КОМПЛЕКСАМИ С ИОНАМИ МЕДИ(II)**

DZEIKALA Aliaksandr, *MSc. (in Biology) PhD student,*
NOWAK Adriana, *PhD (in Biology), Adiunct;*
SYKUŁA Anna, *PhD (in Chemistry), Adiunct;*
ŁODYGA-CHRUŚCIŃSKA Elżbieta, *Prof. (in Chemistry)*
Poland, Lodz University of Technology

Введение. Попытки, направленные на изучение ядерных структур клетки и количественное определение нитевых повреждений ДНК в одиночных клетках организмов, были предприняты еще в 1978г. такими учеными, как Cook и Brazell [1]. Однако лишь в 1984г. шведские исследователи Ostling и Johanson разработали новый метод определения повреждений ДНК [2].

Именно они, в публикации 1984г., заметили, что изображения фрагментов ДНК, мигрировавших в электрическом поле, напоминали астрономические кометы. «Кометы», полученные учеными из Швеции, обладали главными характеристиками космических комет: они имели «голову» и «хвост» [3]. Отсюда и пошло название – метод ДНК-комет (DNA-comet assay).

«Голова» кометы состоит из клубка ДНК, а «хвост» из мигрировавшей ДНК [1], для визуализации генетического материала препараты окрашивают флуоресцентными красителями (бромистый этидий, акридиновый оранжевый и др.), а затем визуализируют с помощью флуоресцентного микроскопа [3]. Впоследствии метод неоднократно модифицировался и совершенствовался с целью его упрощения и повышения чувствительности выявления повреждений клеточной ДНК.

Надо четко представлять, что «комета» образуется не из клетки живого организма, а именно из ее ДНК. Помещенная в агарозный слой суспензия клеток образует полости, которые в процессе лизиса занимает ДНК этих клеток. Все дальнейшие манипуляции в методе ДНК-комет осуществляются именно с ДНК.

Материалы и методы исследования. В настоящей работе представлены результаты оценки уровня повреждений ДНК раковых клеток линии HeLa, вызванных основаниями Шиффа на основе гесперетина (hesperetin) и их комплексов с ионами меди(II), структуры исследуемых соединений представлены на рисунке 1. Гесперетиновые основания Шиффа синтезированы в результате реакции флавоноида с *N*-бензоил гидразином (*N*-benzoyl hydrazine) – HHSB и изониазидом (isoniazid) – HIN. Получение основания Шиффа являлись основой для синтеза их комплексов с ионами меди(II). Структура и физико-химические свойства лигандов и их комплексов охарактеризованы с помощью, спектроскопии ядерного магнитного резонанса ядер ^1H и ^{13}C , инфракрасной спектроскопии, абсорбционной спектрофотометрии, элементного анализа (Lodyga-Chruscinska et al. 2015).

Культура клеток. Клеточная линия аденокарциномы шейки матки человека (HeLa) использовалась в качестве модельной клеточной линии в исследовании. Клетки культивировали в течение 7 дней при 37°C в атмосфере 5% CO_2 с использованием модифицированной Дульбекко среды (DEME, Sigma), дополненной 10% фетальной сывороткой теленка (FBS, Gibco), 4 mM GlutaMAXTM (Gibco), 25 mM HEPES (Sigma), 100 $\mu\text{g/mL}$ стрептомицина и 100 IU/mL пенициллина (Sigma).

Метод ДНК-комет (comet assay). Конечную концентрацию клеток HeLa в каждом образце доводили до 10^5 клеток/mL. 900 μL клеток инкубировали с 100 μL каждого соединения при 37°C в течение 1 часа. Все концентрации тестируемых соединений были свежеприготовлены непосредственно перед добавлением в культуру клеток линии HeLa. Конечные концентрации соединений: 1, 10 и 50 μM .

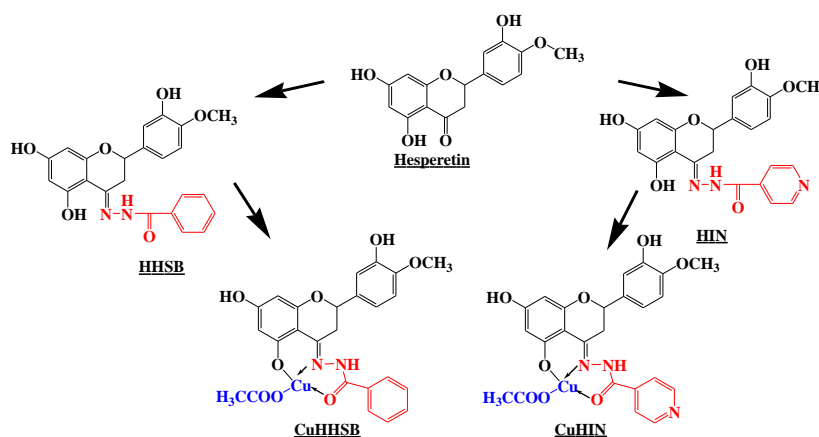


Рисунок – Химическая структура гесперетиновых производных оснований Шиффа HHSB, HIN и комплексов меди (II) CuHHSB, CuHIN.

Анализ комет проводили в щелочных условиях ($\text{pH} > 13$) в соответствии с процедурой Singh et al. 1988 с некоторыми изменениями (Klaude et al. 1996; Błasiak & Kowalik 2000). После инкубации клетки центрифугировали ($182 \times g$, 15 мин), декантировали, суспендировали в 0,75% LMP (низкая температура плавления агарозы), по истечению 10 мин наносили на слайды, предварительно покрытые 0,5% NMP (нормальная температура плавления агарозы) и лизировали. После часовой обработки в лизирующем буфере [2,5 M NaCl, 1% Triton X-100, 0,1 M EDTA и 10 mM Tris

(рН 10)] при 4⁰С, препараты помещены в электрофорезную камеру на 20 мин при 4⁰С в щелочной буфер [300 μ М NaOH и 1 μ М EDTA], а затем подвергнуты электрофорезу в течение 20 мин при напряженности электрического поля 0,73 В/см (300 мА) при той же температуре. После электрофореза проводили нейтрализацию дистиллированной водой. После чего слайды слегка подсушили и фиксировали.

Для окраски ДНК использовали 2,5 μ g/mL пропидиевый йодид (propidium iodide). Визуализацию ДНК-комет проводили с помощью флюоресцентного микроскопа с использованием объектива \times 200 (Nikon, Япония) и видеосистемы на основе цифровой камеры с программой анализа изображений – Lucia-Comet v. 7.0 (Laboratory Imaging, Прага, Чешская Республика). В качестве критерия поврежденности ДНК использовали % ДНК в хвосте комет.

Результаты и обсуждение. генотоксическую активность лигандов HNSB и HIN, а также комплексов CuHNSB и CuHIN тестировали на опухолевых клетках линии HeLa в трех концентрациях: 1, 10 и 50 μ М, результаты исследований представлены в таблице. Положительным контролем в данной серии экспериментов были клетки линии HeLa, инкубировавшиеся в течение 1 часа в присутствии цисплатины (cisplatinum) при 37⁰С.

Таблица – Повреждение ДНК (\pm S.E.M.) в клетках линии HeLa после электрофореза для исследуемых соединений, выраженных в % ДНК в хвосте кометы. Количество клеток, проанализированных в каждом повторении, составляло не менее 50 ДНК-комет для каждого соединения.

Соединение	Концентрации соединений		
	50 μ М	10 μ М	1 μ М
	% ДНК в хвосте кометы (\pm S.E.M.)		
Cisplatin	66.1 \pm 4.2	43.1 \pm 5.1	21.9 \pm 4.4
HNSB	68.8 \pm 4.1	43.8 \pm 2.4	28.8 \pm 4.1
CuHNSB	47.8 \pm 3.8	27.1 \pm 3.5	30.3 \pm 4.6
HIN	46.7 \pm 3.3	35.5 \pm 4.7	28.9 \pm 3.5
CuHIN	33.2 \pm 4.0	17.4 \pm 2.9	15.6 \pm 1.8

Из таблицы следует, что генотоксичность цисплатина и HNSB была самой высокой в сравнении с исследуемыми соединениями: от 21,9% \pm 4,4% до 66,1% \pm 4,2% и от 28,8% \pm 4,1% до 68,8 \pm 4,1% для цисплатина и HNSB, соответственно. Как HNSB, так и его комплекс с медью показали генотоксическую активность, однако лиганд HNSB показал большую генотоксическую активность, чем его комплекс CuHNSB, что было лучше продемонстрировано в случае более высоких концентраций – 10 и 50 μ М. В случае 1 μ М различия не были заметны, 28,8 \pm 4,1% и 30,3% \pm 4,6% для HNSB и CuHNSB, соответственно. Более низкую генотоксичность к клеткам линии HeLa, проявлял комплекс CuHIN, чем HIN. % повреждения ДНК в хвосте кометы, вызванный при концентрации 1 μ М CuHIN, был почти в два раза ниже (15,6 \pm 1,8%), чем в присутствии HIN (28,9 \pm 3,5%).

Полученные данные свидетельствуют о том, что гесперетиновые производные оснований Шиффа и комплексов с ионами металлов являются перспективным классом органических соединений, которые могут использоваться в качестве потенциальных лекарственных препаратов.

Список использованных источников

1. Cook, P. R. Characterization of nuclear structures containing superhelical DNA / P. R Cook., I. A. Brazell // J. Cell Sci. – 1976. – V. 22. – P. 303-324.
2. Ostling, O. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells / O. Ostling, K. J. Johanson // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1984. – V. 123. – P. 291-298.
3. Liao, W. The comet assay: A sensitive method for detecting DNA damage in individual cells / W. Liao, M. A. McNutt, W.-G. Zhu // Methods. – 2009. – V. 48. –P. 46-53.